



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRAS**  
**DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE AQUICULTURA**

**PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS DE SURUBINS VACINADOS E  
SUPLEMENTADOS COM PROBIÓTICO.**

**Scheila Anelise Pereira**

**Florianópolis/ SC**  
**2013**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRAS**  
**DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE AQUICULTURA**

**PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS DE SURUBINS VACINADOS CONTRA E  
SUPLEMENTADOS COM PROBIÓTICO.**

**Scheila Anelise Pereira**

Trabalho de conclusão apresentado ao curso de  
graduação de Engenharia de Aquicultura da  
Universidade Federal de Santa Catarina. Orientador:  
Prof. Dr. Walter Quadros Seiffert. Supervisor: Dr. José  
Luiz Pedreira Mouriño.

**Florianópolis/SC**

**2013**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Pereira, Scheila Anelise

PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS DE SURUBINS VACINADOS E  
SUPLEMENTADOS COM PROBIÓTICO. / Scheila Anelise Pereira ;  
orientador, Walter Quadros Seiffert ; co-orientador, José  
Luiz Pedreira Mourião.. - Florianópolis, SC, 2013.  
28 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -  
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências  
Agrárias. Graduação em Engenharia de Aquicultura.

Inclui referências

1. Engenharia de Aquicultura. 2. Doença de peixe. 3.  
Pseudoplatystoma. 4. septicemia hemorrágica. 5. Weissella  
cibaria,. I. Quadros Seiffert, Walter . II. Pedreira  
Mourião., José Luiz . III. Universidade Federal de Santa  
Catarina. Graduação em Engenharia de Aquicultura. IV. Título.

*Dedico à minha amada mãe, Vera, a eterna e incondicional incentivadora dos meus sonhos, pelo apoio, encorajamento, pela confiança no meu potencial nesta pesquisa, pelo carinho, amor e pelos inestimados ensinamentos que formaram meu caráter e construíram minha história.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por sempre iluminar meu caminho e minhas decisões profissionais,

Ao meu professor e orientador Walter Quadros Seiffert pela orientação e apoio,

Ao amigo e supervisor José Luiz Mouriño que com muita animação e alegria me compreendeu e auxiliou no desenvolvimento desse trabalho,

Ao professor e amigo Luis Vinatea, ao Felipe do Nascimento Vieira e Bruno da Silva pelos ensinamentos, conselhos e correções durante a confecção deste trabalho,

A Gabriella do Vale Pereira pela sua dedicação e paciência, procurando sempre me ajudar em tudo que necessitei.

Aos grandes amigos do laboratório que fizeram meus dias melhores e mais alegres: a Karine Goulart pelo carinho, compreensão e amizade; a Gabriela Soltes pelas inúmeras ajudas; a Norha Bolívar pela atenção e paciência; a Marizinha Soares por me assistir nos meus problemas pessoais e no andamento deste trabalho; a Juliana Rosa pelo seu jeito meigo de ser, transformando os dias mais doces; a Jessica Melo pelas confissões; a Geny Vieira pela sua companhia e ensinamentos; a Marcela Yamashita pelo companheirismo; ao Gabriel Jesus e Marcello Mendes pelos momentos extrovertidos. Todos contribuíram de uma forma ou de outra para a elaboração e conclusão desse trabalho,

Aos amigos queridos da graduação Eliziane Silva, Ariane Martins, Giulia Costa, Cibeli da Silva, Lucas Nunes e todos aqueles que de alguma forma contribuíram para minha formação e não foram citados,

A minha querida mãe, Vera Lucia Pereira, uma mulher batalhadora, que sempre me ensinou a nunca desistir dos meus sonhos, mostrou-me que os empecilhos aparecem em nossa caminhada, mas não devemos fraquejar, me incentivou e ajudou ao longo deste trabalho.

## RESUMO

Este estudo avaliou a eficiência da vacinação intraperitoneal (ip) contra *Aeromonas hydrophila* com reforço oral e suplementação com o probiótico *Weissella cibaria* em surubins híbridos (*Pseudoplatystoma corruscans* x *P. reticulatum*). Foram avaliados os parâmetros imunológicos concentração de proteína total, imunoglobulina total, lisozima, título de aglutinação e título antimicrobiano, após 41 dias de experimento. Os tratamentos consistiram em surubins híbridos não vacinados e não suplementados com probiótico (C), apenas suplementados com probiótico (P), apenas vacinado intraperitoneal com reforço oral (V) e vacinados intraperitoneal com reforço oral e suplementação com probiótico (PV). O reforço oral durou quatro dias, e foram fornecidos quatro vezes ao dia. A concentração de lisozima foi significativamente maior no grupo PV, em relação aos demais grupos. O título aglutinante do plasma, por sua vez, mostrou um aumento significativamente maior nos grupos V e PV em comparação aos de mais. Quanto a concentração de proteína total, imunoglobulina e título antimicrobiano não apresentam diferença entre os grupos avaliados. Dessa forma, pode-se inferir que os animais vacinados que receberam também a suplementação probiótica mostraram melhorias significativas em alguns parâmetros imunológicos.

**Palavras-chave:** Doença de peixe, *Pseudoplatystoma*, septicemia hemorrágica, *Weissella cibaria*, imunologia.

## ABSTRACT

This study evaluated the efficiency of intraperitoneal vaccination (ip) in hybrid catfishes (*Pseudoplatystoma corruscans* and *P. reticulatum*), challenge with *Aeromonas hydrophila*, furthermore was added an oral strengthening supplementation with the probiotic *Weissella cibaria*. Were evaluated the immunological parameters total protein, total immunoglobulin, lysozyme, agglutination titer and antimicrobial title, after 41 days of experiment. The treatments consisted of hybrid catfishes: non vaccinated and without supplementation (C); only supplemented with probiotic (P); intraperitoneal vaccinated and oral strengthening (V); and intraperitoneal vaccinated with oral strengthening and supplemented with probiotic (PV). The oral reinforcement was given during four days being provided four times per day. The lysozyme concentration was significantly higher in the PV treatment, if compared with others. The title binder plasma demonstrated a significant increase in treatments V and PV compared with others. Regarding the concentration of total protein, immunoglobulin and antimicrobial title, did not show differences between treatments. Thus, it can be inferred that vaccinated animals, that received probiotic supplementation, also showed significant improvements in certain immunological parameters.

**Palavras-chave:** Fish Disease, *Pseudoplatystoma*, hemorrhagic septicemia, *Weissella cibaria*, immunology.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Figura esquemática do cruzamento do pintado ( <i>P. corruscans</i> ) com o cachara ( <i>P. reticulatum</i> ), obtendo o surubim híbrido. ....	3
<b>Figura 2:</b> Desenho esquemático da definição de probiótico. ....	6
<b>Figura 3:</b> Representação das células e componentes responsáveis pelos sistemas; imune inato e adaptativo de peixes. ....	11
<b>Figura 4:</b> Esquema ilustrativo do período experimental. ....	15
<b>Figura 5:</b> Concentração de lisozima ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) do plasma de surubins híbridos não vacinados e não suplementados com probiótico (C); apenas suplementados com probiótico (P); apenas vacinado intraperitoneal com reforço oral (V) e vacinados intraperitoneal com reforço oral e suplementação com probiótico (PV). ....	18
<b>Figura 6:</b> Concentração de proteínas totais (A) e concentração de imunoglobulina total (B) do plasma de surubins híbridos não vacinados e não suplementados com probiótico (C); apenas suplementados com probiótico (P); apenas vacinado intraperitoneal com reforço oral (V) e vacinados intraperitoneal com reforço oral e suplementação com probiótico (PV). ....	19
<b>Figura 7:</b> Resultados do título de aglutinação ( $\log_2 x+1$ ) do plasma de surubins híbridos não vacinados e não suplementados com probiótico (C); apenas suplementados com probiótico (P); apenas vacinado intraperitoneal com reforço oral (V) e vacinados intraperitoneal com reforço oral e suplementação com probiótico (PV). ....	21
<b>Figura 8:</b> Resultado do título antimicrobiano ( $\log_2 (x+1)$ ) do plasma de surubins híbridos não vacinados e não suplementados com probiótico (C); apenas suplementados com probiótico (P); apenas vacinado intraperitoneal com reforço oral (V) e vacinados intraperitoneal com reforço oral e suplementação com probiótico (PV). ....	22



**LISTA DE TABELAS**

**Tabela 1:** Vantagens e desvantagens da administração de vacina oral, de imersão e por injeção..... 8

**Tabela 2:** Vantagens e desvantagens de vacinas inativadas e atenuadas. .... 9

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1. Surubim .....	1
1.2. Bacterioses em peixes .....	3
1.1. Probiótico .....	5
1.2. Vacinação .....	7
1.3. Imunologia de peixes .....	10
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>12</b>
2.1. Objetivo Geral .....	12
2.2. Objetivos Específicos .....	12
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>13</b>
3.1. Material Biológico .....	13
3.2. Preparo da vacina .....	13
3.3. Preparo do reforço oral.....	13
3.4. Preparo probiótico.....	13
3.4.1 Contagem de probiótico na ração .....	14
3.5. Delineamento experimental .....	14
3.6. Parâmetros imunológicos .....	15
3.6.1. Lisozima .....	15
3.6.2. Proteína total e Imunoglobulina .....	15
3.6.3. Aglutinação .....	16
3.6.4. Antimicrobiano .....	16
3.7. ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	17
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>17</b>
<b>5. CONCLUSÃO .....</b>	<b>22</b>
<b>6. CONSIDERAÇÕES FINIAS .....</b>	<b>22</b>
<b>7. REFERENCIAS .....</b>	<b>23</b>

## 1. INTRODUÇÃO

A aquicultura mundial vem crescendo nos últimos anos, fato comprovado com a piscicultura continental, que obteve uma produção de 59,9 milhões de toneladas em 2010, superando o ano de 2009 em 7,5 % (FAO, 2012).

O Brasil, por sua vez, apresenta um crescimento forte e contínuo, destacando-se como terceiro maior produtor aquícola das Américas (FAO, 2012). Em 2010, a produção aquícula nacional foi de 479.399 t, apresentando um aumento de 15,3% em relação à produção de aquicultura de 2009. Somente a piscicultura continental contribuiu com 394.340 t, representando 82,3% da produção total em aquicultura em 2010. Já entre os anos de 2008 a 2010, a piscicultura continental apresentou um incremento de aproximadamente 40%, destacando-se a região sul como a maior produtora, possuindo uma produção de 133.425,1 t em 2010. Tal fato deve-se ao desenvolvimento do setor, atrelado a ampliação de políticas públicas (BRASIL, 2010).

Dentre os peixes mais cultivados em águas continentais, a tilápia e as carpas são as de maior importância. Juntas, as espécies somam 250.029,8 t, contribuindo com 63,4% da produção nacional de piscicultura em 2010, seguido dos peixes redondos (tambaqui, tambacu e pacu), que representaram juntos 97.179,6 t, colaborando com 24,6% da produção total (BRASIL, 2010).

Um grupo de peixes nativos que apresenta grande potencial de crescimento é o surubim, pois só no ano de 2010 obteve uma produção de 2.486,5 t, e entre os anos 2008 e 2010 apresentou um aumento de aproximadamente 40% em sua produção (BRASIL, 2010). Isto se deve à excelente qualidade de carne, sabor suave, cor clara, pouca presença de espinhos intramusculares e alto preço de mercado, este peixe é bastante procurado pelos exportadores de pescado, além de apresentar alto rendimento de carcaça (72-74%) e de filé (47-50%). Em condições de cultivo, podem chegar a dois quilos em um ano (CAMPECHE et al., 2011; CAMPOS, 2004; ZANIBONI-FILHO, 2004).

### 1.1. Surubim

Os surubins, assim comumente chamados, são bagres da ordem siluriforme, da família Pimelodidae, do gênero *Pseudoplatystoma*, sendo assim, caracterizados como peixes de couro. Possuem o corpo roliço e alongado, e a cabeça achatada, contendo três pares de barbilhões próximos à boca, e o primeiro raio das nadadeiras dorsal e peitoral são formadas de um acúleo forte e pungente (BRITSKI; SATO; ROSA, 1988).

Dentre as oito espécies identificadas por Buitrago-Suárez e Burr (2007) do gênero *Pseudoplatystoma*, pode se destacar: o cachara, *Pseudoplatystoma reticulatum*, encontrado nas bacias dos rios Paraná e Amazônica; e o pintado, *P. corruscans*, presente nas bacias do rio Paraná e São Francisco.

O *P. reticulatum*, mais frequentemente encontrado, apresenta manchas com formatos variados em todo o corpo, com faixas pretas irregulares similares ao padrão trigado de pigmentação, enquanto

que, o *P. corruscans* possui um padrão de manchas pretas circulares sobre todo o corpo (ZAMBONI-FILHO, 2004). São peixes de hábitos preferencialmente noturnos, em ambiente natural alimentam-se de peixes na coluna de água. Durante o dia permanecem quase imóveis no fundo do corpo de água (ZAMBONI-FILHO, 2004; CAMPOS, 2010). O cultivo comercial de surubim iniciou-se no Brasil em 1997, sendo cultivado em quase todas as regiões brasileiras, para atender diferentes fins. Entre eles, destacam-se a pesca esportiva, principalmente na região sul e sudeste; abate e beneficiamento; e mais recentemente, para fins ornamentais. Existe ainda perspectiva de crescimento na produção devido ao potencial de exportação das espécies (CAMPOS, 2004; ZANIBONI-FILHO, 2004).

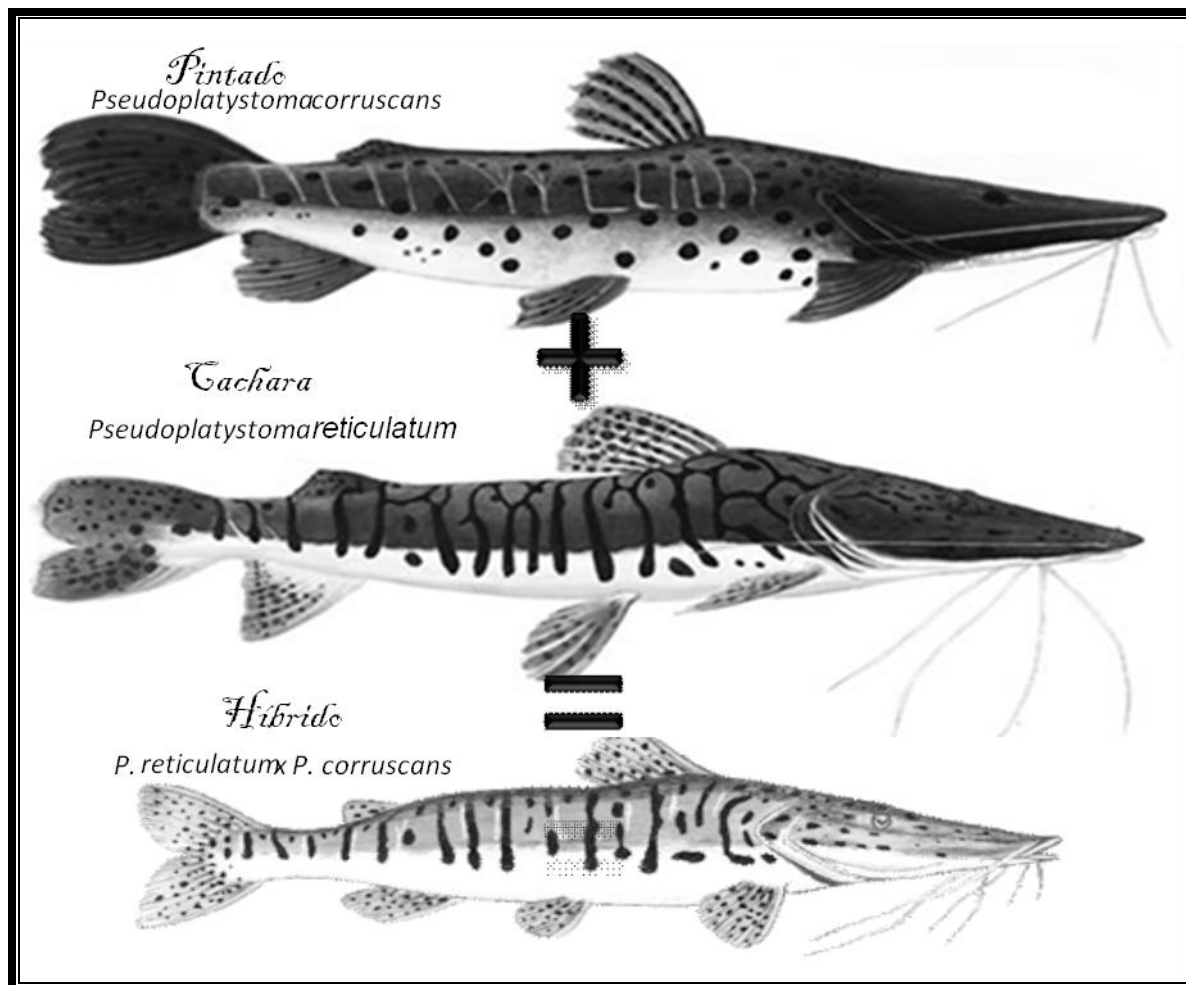
A produção de surubins vem crescendo no Brasil, principalmente na Região Centro-Oeste, por apresentarem características comerciais e zootécnicas indispensáveis, como rápido crescimento, podendo alcançar 1,5 kg em 12 meses, e a sua eficiente conversão alimentar, entre 1,7-2,5 (INOUE et al., 2009).

Porém, a expansão da produção é limitada principalmente pela dificuldade de reprodução em cativeiro. Este fato fica evidente na larvicultura, onde ocorrem as maiores taxas de canibalismo, com sobrevivência em torno de 10 a 50% (ANDRADE et al., 2004; CAMPOS, 2004), e também na alevinagem. Estas condições interferem diretamente no aumento do preço dos alevinos (INOUE et al., 2009).

Uma alternativa para avançar a produção tomada por empresas particulares foi à criação de híbridos, pois de acordo com os mesmos, acredita-se que estes sejam indivíduos mais dóceis, com melhor sobrevivência e crescimento, principalmente no período de larvicultura. Entretanto, nenhum estudo científico comprovou essas observações, logo, seriam necessários mais estudos, para conferir credibilidade a tais afirmações (INOUE et al., 2009).

Uma linhagem usualmente comercializada é o híbrido entre *P. corruscans* e *P. reticulatum* (Figura 1), que apresentam grande potencial crescimento que as linhagens puras. Isto se deve, em parte, à expressão da heterose advinda deste cruzamento, corroborando com as afirmações de produtores e fornecedores de alevinos híbridos (CREPALDI et al., 2003 apud CREPALDI et al., 2006). Este híbrido é o mais produzido entre os vários produtores que trabalham com estas espécies, sendo que, muito esporadicamente, ocorre a venda de peixes puros. Essa preferência na produção de híbrido deve-se, principalmente, a facilidade na obtenção de desova das fêmeas de cachara (*P. reticulatum*) por um período maior durante o ano (CAMPOS, 2010).

**Figura 1:** Figura esquemática do cruzamento do pintado (*P. corruscans*) com o cachara (*P. reticulatum*), obtendo o surubim híbrido.



Fonte: Silva, 2010

## 1.2. Bacterioses em peixes

As produções aquícolas, como o cultivo de bagres híbridos no sul do Brasil, são vulneráveis aos impactos de diversas doenças e condições ambientais. Os surtos de doenças nos últimos anos têm afetado inúmeras criações, como o Salmão do Atlântico, no Chile, as ostras, na Europa, e carcinicultura marinha, em vários países da Ásia, América do Sul e África, resultando em perda parcial ou total da produção. Consequentemente, são incalculáveis os prejuízos financeiros (FAO, 2012).

Campos (2004) já relatava perdas na produção de surubim de até 80%, possivelmente causados por bacterioses. Os animais apresentavam hemorragia no intestino e ânus, lesões externas e vermelhidão na base das nadadeiras.

O aumento na prevalência de doenças bacterianas pode levar a perdas significativas na produção (PEIXOTO et al., 2012). Isto se deve à rápida proliferação das bactérias, mortalidades elevadas e consequentemente surtos em curto intervalo de tempo, ou ainda, podem-se desenvolver lentamente, com menos gravidade e resistir ao um longo período (SILVA, 2010).

Entre as bacterioses isoladas de surtos de mortalidade em piscicultura podem-se destacar sete gêneros *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Flavobacterium*, *Edwardsiella*, *Streptococcus*, *Enterococcus* e *Aeromonas* (PAVANELLI; EIRAS; TAKEMOTO, 1998; AUSTIN; AUSTIN, 2007; MARTINS et al., 2008; SILVA et al., 2012). Dentre estes, o gênero *Aeromonas* é amplamente distribuído nos ambientes aquáticos, podendo crescer em temperaturas que variam de 5°C a 37°C. São microorganismos Gram-negativos, com formato de bastonetes, que estão presentes na superfície e brânquias de peixes. São anaeróbicos facultativos, de oxidase positiva (KOZINSKA, 2007).

As *Aeromonas* móveis, dentro do gênero *Aeromonas*, são consideradas de grande patogênicidade, por serem agentes causadores de septicemia hemorrágica bacteriana (BHS, do inglês *Bacterial Hemorrhagic Septicemia*), e por atingirem uma vasta variedade de espécies de peixes continentais (SILVA et al., 2012). Elas provocam a ruptura de pequenos vasos sanguíneos, lesões superficiais pequenas, descamação e despigmentação da epiderme, hemorragias na cabeça, boca, nadadeiras, víceras e brânquias, levando à anemia e à hiperventilação no opérculo. Outros sintomas são: a redução total ou parcial da alimentação, escurecimento da pele, natação errática, letargia, curvatura do corpo, exoftalmia e por fim a morte (PAVANELLI; EIRAS; TAKEMOTO, 1998; WOO; BRUNO, 2003; DUNG et al., 2008).

Segundo Holliman (1993), dentre as *Aeromonas* móveis, as cepas de *A. hydrophila* são consideradas as mais virulentas. São capazes de produzirem enzimas extracelulares e toxinas, como proteases, citosinas e hemolisinas (KOZINSKA, 2007), além de, possivelmente, causar zoonoses, provocando diarreia e septicemias em humanos (DEODHAR; SARASWATHI; VARUDKAR, 1991).

A transmissão das bacterioses de uma forma geral é horizontal (PAVANELLI; EIRAS; TAKEMOTO, 1998; WOO; BRUNO, 2003; AUSTIN; AUSTIN, 2007), e no caso do pintado e do cachara, pode ser intensificada devido ao forte canibalismo, principalmente nas fases larvais (ANDRADE et al., 2004).

O aparecimento desta bacteriose está frequentemente associada à mudança da estação seca para a chuvosa. É intensificada durante o manuseio e transporte dos peixes (DUNG et al., 2008) e nos períodos de baixas temperaturas, quando os peixes reduzem sua resposta imunológica (KUBITZA, 2000).

Em surtos de mortalidade em 2009 nas fazendas localizadas no Mato Grosso do Sul, região Centro-Oeste do Brasil, foram observadas mortalidades após algum manejo nos peixes quando a temperatura da água estava abaixo de 18°C. Os peixes apresentavam ulcerações na epiderme, letargia, hemorragia na base das nadadeiras, natação errática, anemia, anorexia e hemorragia anal. Com este quadro instaurado, Silva et al. (2012) coletaram surubins enfermos para isolamento da bactéria patogênica. No total, foram isoladas 14 cepas hemolíticas, sendo oito do rim e seis do cérebro. Todas estas foram identificadas como *Aeromonas hydrophila* (99,7%), apresentando o mesmo perfil bioquímico. Dessa forma, apenas uma cepa, isolada do cérebro, foi identificada molecularmente, onde

exibiu 99% de similaridade com o 16S rRNA de *Aeromonas hydrophila hydrophila*. Esta cepa foi utilizada no desafio experimental, onde apenas os peixes desafiados com a maior concentração ( $2 \times 10^8$  *A. hydrophila*·mL<sup>-1</sup>) apresentaram mortalidades ( $50 \pm 12,5\%$ ), e todos os grupos desafiados, independente da concentração, apresentaram sintomas, já os animais não desafiados não apresentaram sintomas externos nem internos. Após o re-isolamento da bactéria dos animais desafiados, constatou-se o mesmo perfil bioquímico no API 20E da *A. hydrophila* (99,7%), comprovando a eficiência do desafio experimental.

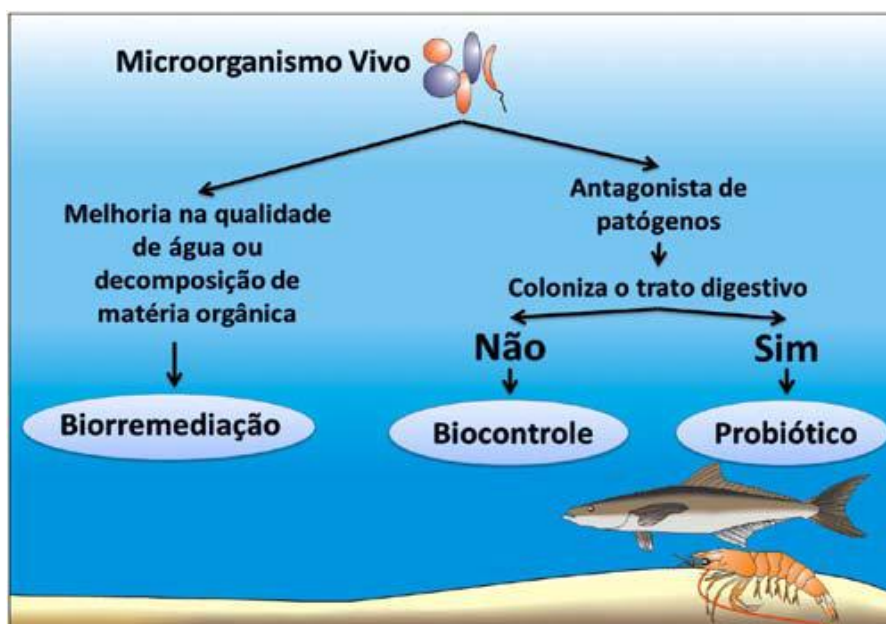
Para solucionar tais problemas na produção piscícola, existe uma crescente busca por substâncias e mecanismos capazes de inibir patógenos e de promover o crescimento animal (LIM; LÜCKSTÄDT; KLESIUS, 2010). No entanto, desde 2006 a União Europeia proibiu o uso de antibióticos na produção animal, devido à poluição de ecossistemas aquáticos e a criação e transferência de bactérias patogênicas resistentes para animais e seres humanos (LÜCKSTÄDT, 2006; ENCARNAÇÃO, 2010).

Dessa forma, o desenvolvimento de alternativas, como probióticos e vacinação para peixes contra doenças bacterianas, têm se mostrado uma ferramenta promissora na aquicultura (SHOEMAKER et al., 2010; PRIDGEON; KLESIUS, 2010; BARBOSA et al., 2011; MOURIÑO, 2012; SILVA et al., 2012).

### **1.1. Probiótico**

Os probióticos na aquicultura são definidos com células microbianas, que ao serem adicionadas na alimentação colonizam e se mantêm vivas no trato digestivo dos animais, de modo a melhorar a condição de saúde dos mesmos (Figura 2). Podem atuar em antagonismo ao patógeno, como biocontrolares (não colonizando o trato) ou como probióticos propriamente dito (colonizando o trato) (GATESOUBE, 1999).

**Figura 2:** Desenho esquemático da definição de probiótico.



**Fonte:** Adaptado por Gatesoupe 1999.

A aplicação de bactérias probióticas benéficas tem se tornado uma alternativa viável pra tratamentos profiláticos. Inúmeros micro-organismos são utilizados na aquicultura com probióticos, e os mais indicados são os de ocorrência natural no ambiente e/ou em peixes ou camarões (DECAMP; MORIARTY, 2006), sendo isolados de lugares onde se deseje reincidi-los, pois dependendo do objetivo de atuação, a cepa isolada pode atuar como probiótico, biocontrolador ou biorremediador (GATESOUPÉ, 1999).

Os probióticos podem atuar das seguintes formas: a) Competir pelos nutrientes e/ou inibir o crescimento de bactérias patogênicas; b) Alterar a composição da comunidade bacteriana, promovendo melhorias na saúde dos animais (DECAMP e MORIARTY, 2006); c) Excluir o organismo patogênico devido a alguma competição; d) Contribuir com fonte nutricional e/ou na digestão enzimática (vide revisão de BALCÁZAR et al., 2006).

Dentre as cepas de bactérias utilizadas como probióticas, as bactérias ácido lácticas têm sido fortemente utilizadas para várias espécies de animais aquáticos. Possuem a capacidade de sobreviver ao longo do trato intestinal, colonizá-lo e alterar a microbiota intestinal, promovendo uma melhoria no sistema imune desses animais (CARNEVALI et al., 2006; VIEIRA et al., 2007; VIEIRA et al., 2008; JATOBÁ et al., 2008; MOURIÑO et al., 2012).

A composição da microbiota intestinal pode ser classificada em: autóctone ou indígena, quando as bactérias são capazes de colonizar a superfície epitelial do intestino do hospedeiro; e alóctone ou transitória, quando as bactérias somente passam pelo trato digestivo, não ocorrendo à colonização (RINGO et al., 2003). Dessa forma, os probióticos adicionados na alimentação podem apenas passar pelo trato e já provocarem efeito, mas este será intensificado se houver colonizarem do trato. Segundo Silva et al. (2005b), somente as bactérias predominantemente autóctones possuem quantidades



populacionais suficientes para influenciarem algumas funções de importância para a saúde do hospedeiro.

Muitos estudos também apontam que a utilização de probióticos não-endógenos podem trazer resultados satisfatórios, às vezes melhores do que os endógenos. Mas, devido à necessidade das bactérias colonizarem e se manterem vivas no trato intestinal, por um tempo razoável, os candidatos probióticos autóctones têm se tornado a base de muitos estudos (GATESOUBE, 2008; MERRIFIELD et al., 2010 a).

Pensando assim, Mouriño et al. (2012) isolaram e selecionaram (*in vivo* e *in vitro*) a cepa probiótica *Weissella cibaria* (CPQBA 001-10 DRM 02) do intestino de surubins híbridos saldáveis, cultivados em Mato Grosso do Sul. Neste mesmo trabalho, surubins híbridos foram alimentados com ração suplementada com *W. cibaria* por 15 dias e obtiveram menor concentração de Vibrios no trato intestinal e melhoria nos parâmetros hemato-imunológicos quando comparado aos demais tratamentos. Por esse motivo, a cepa probiótica escolhida para este trabalho foi a *Weissella cibaria* (CPQBA 001-10 DRM 02).

## 1.2. Vacinação

Vacinação é um termo utilizado para definir qualquer preparo de antígeno. proveniente de um organismo patogênico, capaz de estimular tanto o sistema imune inato quanto o adaptativo dos animais, conferindo-lhe aumento de resistência e proteção duradora contra certa doença (TIZARD, 2002; vide revisão MAGNADOTTIR, 2010).

A vacinação pressupõe que o organismo receptor possua um sistema imune adaptativo, para que possa iniciar uma resposta específica contra os componentes da vacina, resultando em uma memória imunológica para estes compostos. Dessa forma, os indivíduos vacinados são capazes de responder mais rapidamente, e com maior magnitude, a uma posterior exposição ao antígeno presente na vacina (vide revisão MAGNADOTTIR, 2010).

Nos últimos 10 a 20 anos, a vacinação para uma ampla variedade de espécies de peixes vem se estabelecendo, principalmente contra infecções bacterianas, comuns na aquicultura, sendo frequentemente administradas de diferentes formas: por imersão, injeções (ip) ou até mesmo via oral na alimentação (Tabela 1). As vacinações injetáveis são na grande maioria mais eficientes, duradouras e de maior garantia ao produtor, já que cada peixe é tratado individualmente, embora demandem maior pessoal e custo de aplicação, em comparação às de imersão (vide revisão MAGNADOTTIR, 2010; PRIDGEON; KLESIUS, 2010).

**Tabela 1:** Vantagens e desvantagens da administração de vacina oral, de imersão e por injeção.

Administração de vacinas	Vantagens	Desvantagens
<b>Oral</b>	Fácil administração, pois a alimentação faz parte da produção.	Geralmente necessita de revestimento para evitar a quebra no sistema digestivo.
	Estresse mínimo.	Imunidade relativamente curta. Pode ser necessária vacinação adicional.
<b>Imersão</b>	Relativamente fácil à execução, não interrompe muito a produção.	Peixes pequenos e jovens podem requerer uma segunda vacinação.
	Estresse mínimo.	Não é tão eficaz quanto à metodologia por injeção contra alguns patógenos.
<b>Injeção (ip)</b>	Eficaz para muitos patógenos.	Requer mais tempo e pessoal.
	Maior tempo de duração	Peixes com menos de 10 g não responde bem.
	Mais garantia ao produtor, cada peixe é tratado individualmente.	Causa maior estresse nos peixes,

**Fonte:** Adaptado de PRIDGEON; KLESIUS, 2010.

A vacinação oral é um método fácil, que demanda pouca mão de obra, além de causar pouco estresse nos peixes. Porém, o conteúdo da vacina (antígeno) exige um revestimento para que o sistema digestivo não degrade ou perca a eficácia, por isso, a imunidade é curta e possivelmente necessitará de um reforço ou vacinação adicional (PRIDGEON; KLESIUS, 2010).

Entretanto, atualmente existe mecanismo de entrega de antígeno via oral mais eficiente como: a) utilização de nano e micropartículas, onde os antígenos naturais ou sintéticos são geralmente encapsulados dentro de partículas ou ligados covalentemente a elas, sendo que essas partículas são, normalmente, biodegradáveis; b) a aplicação de biofilme como veículo de entrega segura de antígenos (protege-lhe e permite que passe pelo intestino anterior intacto), já existem alguns trabalhos com a criação de biofilme de *A. hydrophila* mostrando resultados satisfatórios no uso deste método; c) o emprego de artêmia na bioencapsulação dos antígenos (PLANT; LAPATRA, 2011); d) outra abordagem pra vacinação oral seria a redução temporária do processo digestivo, para isso utiliza-se concomitantemente a vacina e antiproteases que potencializa a permeabilidade de membrana, possibilitando que a vacine escape da hidrólise digestiva; e) entre muitos outros mecanismos de entrega de vacinas orais (VANDENBERG, 2004).

Além das formas de administração, existem também vários tipos de preparações de vacinas, como inativada, atenuada, fantasmas bacterianos (envelope celular ausente de conteúdo citoplasmático), recombinante, antiparasitária e vacina de DNA (ELLIS, 1997; vide revisão MAGNADOTTIR, 2010). Continuamente, novos tipos estão em desenvolvimento para peixes.

Atualmente, são comumente usados dois tipos de vacinas, as inativadas, como as bacterinas, que estimulam a resposta humoral de anticorpos, e as vacinas atenuadas. Estas últimas são compostas de micro-organismos vivos cultivados, e que não apresentam mais as propriedades patogênicas; ou ainda; que a capacidade da bactéria patogênica de causar a doença tenha sido atenuada ou reduzida. Ambas estimulam tanto a resposta imunitária mediada por células quanto a humoral (Tabela 2) (PRIDGEON; KLESIUS, 2010).

**Tabela 2:** Vantagens e desvantagens de vacinas inativadas e atenuadas.

<b>Preparações de vacinas</b>	<b>Vantagens</b>	<b>Desvantagens</b>
<b>Inativadas</b>	Não existe a preocupação da cepa se tornar virulenta no futuro. Seguro ao meio ambiente.	Mais de uma dose pode ser necessária pra uma resposta inicial e duração pode ser menor que a viva. Mais trabalhosa. O uso de adjuvante pode ser necessário para uma maior eficácia
<b>Atenuadas</b>	Administração mais fácil. Sem necessidade de adjuvante.	Pode causar patogenicidade ou servir de gatilho para outras doenças Pode prejudicar o meio ambiente,

**Fonte:** Adaptado de PRIDGEON; KLESIUS, 2010.

As vacinas inativadas são as mais comuns (FIGUEREDO; LEAL, 2008), por serem mais seguras ao meio ambiente e não se tornarem virulentas ao animal (PRIDGEON; KLESIUS, 2010). A inativação pode ser realizada por altas temperaturas ou pelo método de formalina. A vacina também pode conter apenas bacterina (bactéria inativas) e/ou toxóides (produtos extracelulares inativados), o qual é o produto do crescimento bacteriano, como hemolisinas, as lipases, enterotoxinas e proteases. Este toxóide é adicionado na vacina para aumentar eficácia e a produção de anticorpo pelos peixes (SHOME; SHOME, 2005).

A eficácia e a duração das vacinas dependem do agente patogênico, da via natural de infecção, da fase de crescimento do peixe, do tipo de produção, de fatores ambientais, como a temperatura, e outras considerações logísticas. Para obter uma proteção adequada, uma via de administração específica ou mesmo várias rotas podem ser necessárias (PRIDGEON; KLESIUS, 2010). Dessa forma, a vacinação com reforço é normalmente utilizada para aumentar a duração (ROMALDE et al., 2004), a eficiência, a memória e a produção de anticorpos (CHENG et al., 2010).

A administração da vacina oral pode ser uma boa forma de realizar o reforço, já que é de baixo custo, não exige muito manuseio dos animais, reduz o estresse, e é indicado para imunização em massa. Além disso, apresenta grande potencial de utilização comercial, desde que desenvolvidas tecnologias pra aumentar a quantidade de antígeno e melhoria nos mecanismos de encapsulação, para que não perca eficiência devido a hidrólise no estômago (VANDENBERG, 2004).

A vacinação oral já é utilizada há 30 anos, especialmente na cultura de salmão, sendo adicionada nas dietas comerciais. Outros exemplos de sucesso de vacinação em peixe é a vacina contra a septicemia entérica de bagre do canal (*Ictalurus punctatus*), causada pela bactéria Gram-negativa

*Edwardsiella ictaluri*, onde os produtores afirmam que os peixes vacinados crescem mais rápido e apresentam melhores conversões alimentares (PRIDGEON; KLESIUS, 2010).

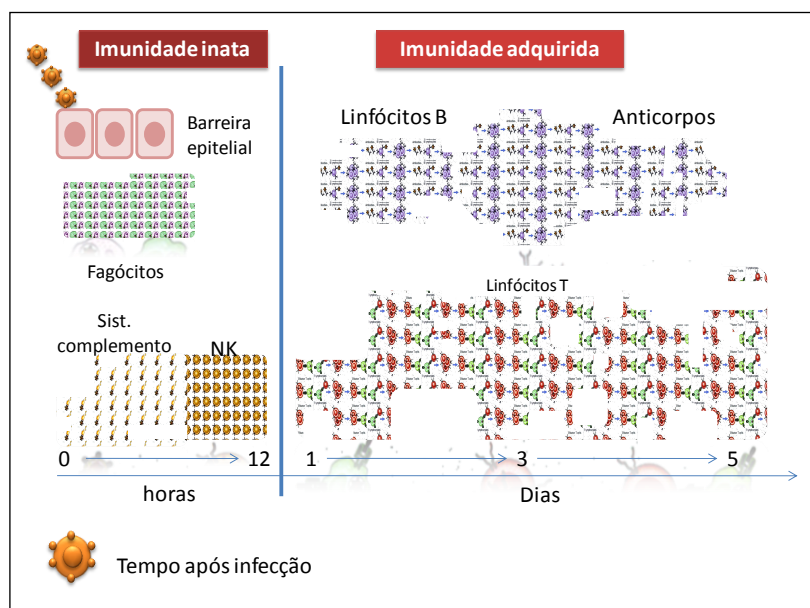
Outros trabalhos de vacinação para peixes também mostram resultados satisfatórios como: o estudo realizado com tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), que receberam vacinação polivalente administrada por diferentes vias, e resultou em um aumento no estímulo e melhorias na resposta hemato-imunológica (SILVA et al., 2009); e a pesquisa realizada com surubins híbridos contra *Aeromonas hydrophila*, vacinados por injeção e por imersão, e que mostraram melhorias significativas nos parâmetros imunes, como valores maiores de proteína total e imunoglobulinas, a aglutinação título e atividade antimicrobiana do soro nos animais vacinados i.p, enquanto que a concentração de lisozima foi superior nos peixes vacinados por imersão (SILVA et al., 2012).

### **1.3. Imunologia de peixes**

O sistema imunológico dos peixes é fisiologicamente semelhante aos outros vertebrados, possuindo algumas poucas diferenças. Dessa forma, contam com o sistema inato e adaptativo (memória imunológica). A imunidade não específica é de fundamental importância para os peixes, além de, desempenhar papel importante na ativação da resposta imunológica adquirida (vide revisão MAGNADOTTIR, 2006, 2010; vide revisão URIBE et al., 2011).

Tanto o processo de defesa inato (não específico) quanto o adaptativo (específico) podem apresentar respostas de dois tipos: a imunidade mediada por células e a imunidade humoral (Figura 3). A imunidade celular não específica envolve os monócitos e os leucócitos granulares, sendo responsáveis por vários processos de resposta imune inata, como: inflamação, fagocitose, fagocitose com células acessórias e citotoxicidade não específica. Já a resposta humoral não específica é composta de varias substâncias como lisozima, sistema complemento, interferon, proteína C reativa, transferrina e lectina, que são encontradas no muco, soro e também ovos dos peixes e acabam por inibir o crescimento de microorganismos infecciosos (SECOMBES, 1996; YANO, 1996). Dessa forma, a primeira e importante defesa dos peixes no sistema inato é a barreira física e mecânica decorrente das células epitélies e a mucosa da pele, possuindo vários parâmetros de defesa como; peptídeo antimicrobiano, fatores complementares e imunoglobulinas (glicoproteínas que interagem com partículas estranhas ao organismo, os chamados antígenos) (vide revisão MAGNADOTTIR, 2010).

**Figura 3:** Representação das células e componentes responsáveis pelos sistemas; imune inato e adaptativo de peixes.



**Fonte:** Adaptado de Abbas e Litchman (2003).

O sistema complemento compreende uma rota alternativa de defesa prévia a patógenos. Como atividade hemolítica, geralmente elevada no soro de peixes; a forte atividade de lisozima, que é importante enzima bactericida; e as lectinas, que também são importante fator defesa inata, já que se ligam a alguns açúcares presentes na membrana dos patógenos, e promovem a aglutinação ou opsonização (vide revisão MAGNADOTTIR, 2010).

A atividade antimicrobiana do soro sanguíneo dos peixes teleósteos se deve a diversos tipos de proteínas e enzimas. A lisozima é uma enzima importante no combate a infecções, uma vez que, promove a hidrólise, principalmente, da parede celular de peptidoglicana de bactérias Gram-positivas, levando à lise celular, mas também é conhecida a ação contra bactérias Gram-negativas. Aparentemente, as principais fontes de lisozimas são os monócitos/macrófagos e neutrófilos (vide revisão MAGNADOTTIR, 2006; vide revisão URIBE et al., 2011).

Existem ainda outros tipos de inibidores antimicrobianos, como os peptídeos antimicrobianos, elemento chave da defesa inata, que são encontrados no tegumento, muco, fígado e tecidos branquiais. Os peptídeos antimicrobianos possuem ação rápida e eficaz, pois atuam diretamente nas membranas dos patógenos, quebrando-as, inibindo as proteases como  $\alpha 2$ -macroglobulina e  $\alpha 1$ -antitripsina, as quais inibem a ação de toxinas proteolíticas produzidas pelas bactérias (vide revisão MAGNADOTTIR, 2010; vide revisão URIBE et al., 2011).

Os processos de aglutinação e inibição de patógenos são dois mecanismos importantes na resposta imune dos peixes teleósteos, realizados por moléculas presentes no soro sanguíneo. Tanto as lectinas quanto as imunoglobulinas são as moléculas responsáveis pela aglutinação. As lectinas são proteínas capazes de se ligar a alguns açúcares, principalmente manoses, encontrados na parede de bactérias Gram negativas ou Gram positivas, mas não possuem tanta especificidade quanto as

imunoglobulinas. A maior capacidade de aglutinação é das imunoglobulinas, por possuírem ação mais específica aos antígenos, sendo produzidas pelos linfócitos B (SWAIN; SAHOO; AYYAPPAN, 2006). Silva et al. (2009) relataram em estudos o aumento do título de aglutinação no soro sanguíneo de tilápia do Nilo após vacinação com antígenos polivalentes.

Já a resposta imune específica ocorre devido a um complexo mecanismo de redes celulares especializadas, genes, mensagens bioquímicas e proteínas, que proporcionam subsídios para que o animal responda especificamente às células efectoras, anticorpo e antígeno, com alta afinidade especificidade (URIBE et al., 2011). Tal capacidade está intimamente relacionada com a competência das células fagocitárias em englobar, inativar, degradar as células patogênicas e apresentar o antígeno aos linfócitos, que ao realizarem o reconhecimento passam para sua forma ativa e madura, estimulando os linfócitos B. Os linfócitos B produzem e secretam os anticorpos (tecnicamente chamados de imunoglobulinas), que se ligam aos epítomos dos antígenos das células dos patógenos, inativando-os e/ou sinalizando para as células de defesa. Em momento de reinfecção, os anticorpos serão produzidos de uma forma mais rápida. Os linfócitos T, por sua vez, destroem as células infectadas com o organismo invasor previamente identificado (TAVARES-DIAS; MORAES, 2004; SWAIN; SAHOO; AYYAPPAN, 2006). Dessa forma, a resposta adaptativa não é uma característica hereditária, mas sim uma experiência imunológica de cada indivíduo, que demanda receptores específicos, proliferação de células e proteínas específicas, sendo um processo relativamente lento (vide revisão MAGNADOTTIR, 2010).

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. Objetivo Geral**

Contribuir para a melhoria da condição de saúde de surubins com processos de vacinação e alimentação com probióticos.

### **2.2. Objetivos Específicos**

- Avaliar a alteração imunológica de surubins híbridos após a vacinação intraperitoneal e com reforço oral;
- Avaliar a concentração de proteínas totais, imunoglobulina e lisozimas de surubins híbridos vacinados contra *A. hydrophila*, suplementados ou não com probiótico;
- Avaliar os estímulos do título aglutinante e antibacteriano do plasma dos surubins após aplicação da vacina, reforço e suplementação com probiótico.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Material Biológico

Foram utilizados 192 surubins híbridos, provenientes do cruzamento entre macho de pintado (*Pseudoplatystoma corruscans*) (Agassiz, 1829) e a fêmea de cachara (*P. reticulatum*) (Eigenmann & Eigenmann, 1889) da empresa Piscicultura Pirái, localizada no Mato Grosso do Sul.

A cepa hemolítica de *Aeromonas hydrophila* (CPQBA 228-08 DRM) foi isolada de híbridos doentes de fazendas do estado de Mato Grosso do Sul, durante surtos de mortalidade no ano de 2009 (SILVA et al., 2012).

A cepa bacteriana probiótica utilizada foi *Weissella cibaria* (CPQBA 001-10 DRM 02), isolada e selecionada a partir de surubins híbridos saudáveis e assintomáticos (MOURIÑO et al., 2012).

#### 3.2. Preparo da vacina

Para preparar a vacina bacteriana, a cepa de *A. hydrophila* foi crescida em meio de cultura BHI (do inglês, *Brain Heart Infusion*) por 18 h a 30 °C, inativada com 1% de formalina tamponada a 10% por 18 h a 30 °C, e centrifugadas a 4000 g, a 4 °C, por 30 min. Posteriormente, a bactéria foi ressuspendida em uma solução de tampão fosfato salina, (PBS 1, 0.04 M de fosfato monobásico, 0.16 M de fosfato dibásico, 0.11 M de cloreto de sódio, pH 7.4), resultando em uma concentração bacteriana de  $2 \times 10^8$  CFU·mL<sup>-1</sup>, de acordo com a curva de crescimento da bactéria (absorbância X concentração de bactéria) (SILVA et al., 2012).

O sobrenadante resultante do processo de centrifugação da vacina foi retirado e aquecido a 100 °C por 30 min, a fim de inativar as toxinas. Posteriormente, o toxóide foi adicionado a uma proporção de 1:10 da solução bacteriana, ou seja, 10% de toxóide para cada volume bacterino desejado (adaptado de ARIJO et al., 2005).

#### 3.3. Preparo do reforço oral

Para reforço oral, utilizou-se a mesma vacina e concentração descritas no subitem 3.2. Preparo da Vacina. Sendo assim, 100 mL da vacina foram pulverizadas com uso de um borrifador, para cada quilograma da dieta. Posteriormente, esta foi homogeneizada e seca a 30 °C durante 12 h em estufa bacteriológica.

#### 3.4. Preparo probiótico

O probiótico foi preparado com a bactéria ácido-láctica *Weissella cibaria*, repicada em tubos de ensaio contendo caldo MRS (do inglês, *Man-Rogosa-Sharpe broth* - Difco®), e incubada a 35 °C por 48 h. Depois de crescida, a cepa probiótica foi aspergida na ração na proporção de 100 mL·kg<sup>-1</sup> do inóculo de *W. cibaria*, na concentração de  $1 \times 10^8$  UFC·mL<sup>-1</sup>. A dieta então foi seca em estufa com

circulação de ar, a 35 °C, por 24 h. Este processo foi repetido três vezes ao longo do experimento (41 dias), para garantir a alta concentração de inoculo na dieta.

#### 3.4.1 Contagem de probiótico na ração

Um grama da ração preparada com probiótico foi macerado com 1 mL de solução salina estéril de 0,65%, e posteriormente diluída serialmente nove vezes em fator 1:10. As diluições de  $10^{-5}$  a  $10^{-9}$  foram semeadas em meio de MRS e TSA (do inglês, *Trypticase Soy Agar*), sendo a MRS incubada a 35 °C por 48 h, e a TSA a 28 °C por 12 h, a fim de averiguar a concentração da *W. cibaria* na ração.

### 3.5. Delineamento experimental

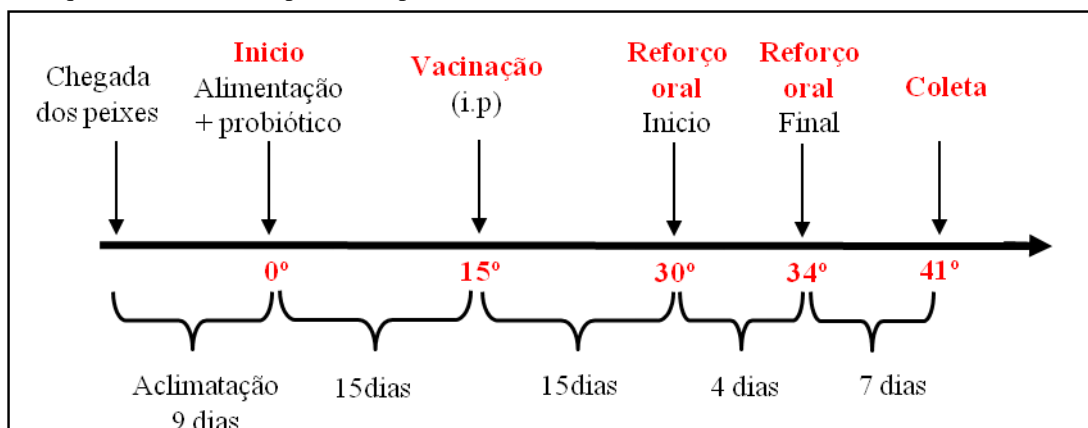
O experimento foi realizado na sala Bioensaio I, pertencente ao Laboratório AQUOS – Sanidade de Organismos Aquáticos, do Núcleo de Estudos em Patologia Aquícola (NEPAQ), Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal de Santa Catarina, em Florianópolis.

Os 192 surubins foram aclimatados por nove dias em 24 caixas de 100L, totalizando oito peixes por tanque. A dieta foi fornecida quatro vezes ao dia, um total de aproximadamente 2,0% da biomassa. O fotoperíodo foi de 0: 24 h de escuro durante o período experimental, visando o maior conforto do animal, já que esta espécie apresenta maior consumo de alimento durante a noite. Diariamente, monitorou-se o oxigênio dissolvido, o pH, a amônia total e o nitrito e, se necessário renovou-se 20 a 60% da água dos tanques. Os tanques estavam acoplados em um sistema de recirculação de água semi-aberto, com filtros mecânicos e biológicos aeróbicos e anaeróbicos, além de luz Ultra Violeta.

Os tratamentos foram realizados em sextuplicata sendo eles: surubins híbridos não vacinados e não suplementados com probiótico (C); apenas suplementados com probiótico (P); apenas vacinado intraperitoneal com reforço oral (V); e vacinados intraperitoneal com reforço oral e suplementação com probiótico (PV).

Após o período de aclimação de nove dias, o grupo suplementado com probiótico (meio de cultura mais *W. cibaria*) passou a receber esta dieta até o fim do experimento, e os demais grupos receberam a mesma ração comercial (supra 42% Juvenil para tanque rede, pellet de 2-4 mm), sem a bactéria probiótica ou meio de cultura. Passados 15 dias do início do experimento, os animais dos grupos V e PV foram vacinados intraperitonealmente (i.p.) contra a bactéria *A. hydrophila*, na dosagem de 0,01 mL da vacina por grama de peixe. Após 15 dias da primeira vacinação, iniciou-se o reforço oral, fornecido quatro vezes ao dia na dieta, por período de quatro dias. Uma semana depois do término do reforço, os peixes foram coletados para posteriores análises (Figura 4).



**Figura 4:** Esquema ilustrativo do período experimental.

### 3.6. Parâmetros imunológicos

Após o término do experimento, três peixes de cada unidade experimental foram amostrados, anestesiados com benzocaína (1 g:10 L). O sangue foi coletado por punção do vaso caudal, com uso de seringas de 3 mL (21G) com anticoagulante, formando um *pool* dos três animais de cada unidade experimental. Posteriormente, o microtubo de 2 mL contendo o *pool* dos peixes foi centrifugado a 1400 g por 10 min, para obtenção do plasma sanguíneo, e armazenado a -20 °C, para posteriores análises imunológicas.

#### 3.6.1. Lisozima

A atividade da lisozima no plasma sanguíneo foi determinada pela metodologia adaptada de Sankaran & Gurnani (1972), onde uma suspensão de *Micrococcus lysodeikticus* liofilizado (Sigma-Aldrich) foi diluída em tampão fosfato salina (PBS 2, 0.04M fosfato monobásico, pH 6.2), na concentração de 0,50 mg·mL<sup>-1</sup>, imediatamente antes de sua utilização.

Vinte microlitros do plasma, em quintuplicata do *pool*, foram semeados em microplaca de fundo chato e adicionados 200 µL da suspensão de células de *M. lysodeikticus* em cada poço. Logo após, foi feita a leitura da absorbância inicial em 492 nm. Posteriormente, incubou-se as microplacas por 10 min a 35 °C, e realizou-se a leitura das absorbâncias finais. A redução na absorbância das amostras foi convertida em concentração de lisozima (µg·mL<sup>-1</sup>), determinada pela curva padrão realizada anteriormente com lisozima de clara de ovos da galinha (HEWL, Sigma-Aldrich).

#### 3.6.2. Proteína total e Imunoglobulina

A proteína total do plasma sanguíneo foi mensurada através do kit para quantificar proteína total (Lab Test ®). A concentração de imunoglobulina total foi mensurada de acordo com o método descrito por Amar et al. (2000), onde misturou-se 50 µL do plasma com 50 µL de solução de polietileno-glicol 12% (PEG) (Sigma-Aldrich). A mistura foi incubada a 25 °C por 2 h, a fim de, precipitar as moléculas de imunoglobulina. O precipitado de imunoglobulina foi removido por centrifugação (5000 g, a 4 °C, por 10 min), e o sobrenadante retirado e mensurado. A quantidade de

proteína total também foi feita pelo uso do kit, utilizando-se albumina bovina para confecção da curva padrão. A concentração de imunoglobulina total está expressa em  $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ , sendo calculada pela fórmula:

$$\text{Total Ig (mg/ml)} = \text{Proteína Total do Soro} - \text{Proteína tratada com PEG}$$

### 3.6.3. Aglutinação

O título aglutinante foi realizado com a bactéria *Aeromonas hydrophila* (CPQBA 228-08 DRM) inativada, da mesma forma como descrito no subtítulo 3.2. Preparação da vacina. A inativação é confirmada semeando 100  $\mu\text{L}$  da solução bacteriana em TSA, incubada por 72 h a 30 °C.

O plasma de cada tratamento foi diluído na proporção de 1:1 em PBS, e diluído serialmente na proporção de 1:2 até o 12º poço, em microplacas de fundo em “U”. Posteriormente, adicionou-se 50  $\mu\text{L}$  da bactéria inativada em todos os poços, incubando a 25 °C por 18 h em câmara úmida (SILVA et al., 2009). A confirmação foi realizada através da formação do *bottom* no fundo do poço, observada em estereomicroscópio. O título de aglutinação foi expresso pela última diluição do soro, que mostrou as suas respectivas atividades e valor transformado em  $\text{Log}_2 (X+1)$ .

### 3.6.4. Antimicrobiano

A atividade antimicrobiana do plasma foi realizada contra duas bactérias: *Aeromonas hydrophila* (CPQBA 228-08 DRM) e *Enterococcus durans* (ATCC 19492), realizada em microplaca de 96 poços com fundo chato, como a metodologia utilizada por Silva et al. (2009). O inóculo da *A. hydrophila* foi cultivado em BHI a 30 °C por 12 h, e *E. durans* em TSB (do inglês *Tryptone Soy Broth*) preparados na concentração de 0,5 na escala de Macfarland, e diluído em meio de cultura Poor broth (PB) 100.000 vezes. Então, 150  $\mu\text{L}$  de PB foram adicionados no 1º poço da linha, e 100  $\mu\text{L}$  nos demais poços, e 50  $\mu\text{L}$  do plasma adicionado ao primeiro poço da linha.

Posteriormente, foi realizada uma diluição seriada de fator 1:2 até o 12º poço. Para controle positivo e o branco, solução salina foi diluída em PB, da mesma forma do que para o plasma. Finalmente, 20  $\mu\text{L}$  da *A. hydrophila* ou da *E. durans* foram adicionados em cada poço da amostra diluída do plasma e do controle positivo.

A microplaca contendo *E. durans* foi incubada a 28 °C por 24 h, e as microplacas contendo *A. hydrophila* foram incubadas a 28 °C por 12 h. O crescimento dos microorganismos foram determinado em leitora de microplaca, no comprimento de onda de 550 nm. A atividade antimicrobiana do plasma é recíproca da última diluição que apresentou atividade bactericida, ou seja, inibição total da bactéria.

### 3.7. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os dados foram analisados pelo teste de Bartlett, para verificar a homocedasticidade. Os dados que não apresentaram variâncias homogêneas foram transformados em  $\log_2 (x+1)$ , e posteriormente submetidos às análises de variâncias unifatorial. Quando necessário, os dados foram submetidos ao teste de separação de médias de Tukey. Todos os testes foram utilizados considerando um nível de significância de  $p < 0,05$ .

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os parâmetros imunológicos de peixes são importante ferramenta, utilizada para a averiguação do estado de saúde do animal. Ao quebrar-se o estado de hemóstase, devido a algum tipo de estresse, doença ou infestação parasitária, o animal acionará seus mecanismos de defesa (FERREIRA; GIL BARCELLOS, 2009).

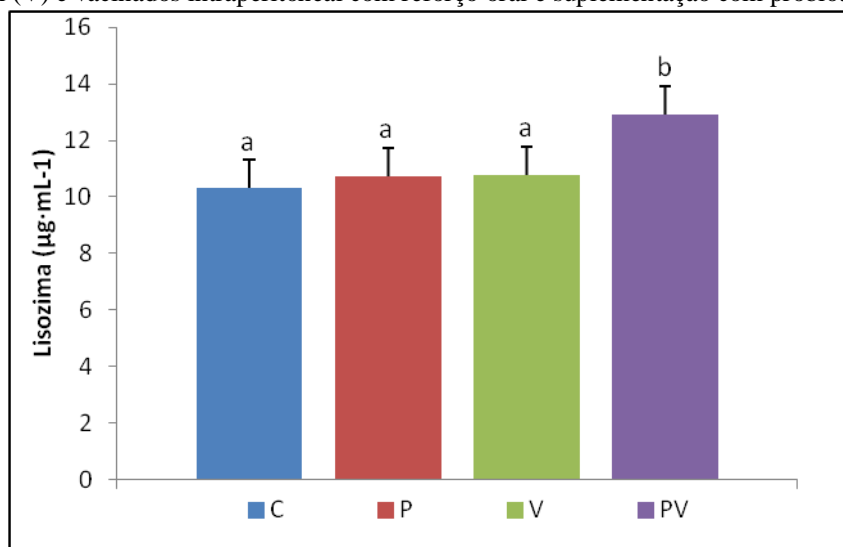
Os peixes vacinados por injeção intraperitoneal, e que receberam o reforço oral e a suplementação com probiótico (PV) obtiveram a maior concentração de lisozima, em comparação aos demais tratamentos (Figura 5). Tal fato pode estar relacionado com aumento da carga microbiana nos animais desse grupo, já que, estes receberam vacinação e probiótico. Segundo Saurabh e Sahoo (2008), a lisozima é uma importante molécula de defesa do sistema imune inato, sendo muito importante na proteção contra invasão microbiana, pois apresenta atividade lítica contra bactérias Gram-positivas e negativas. Um aumento em sua concentração pode indicar melhoria na resposta imune humoral inata. Alguns estudos também mostraram o aumento da atividade da lisozima em kinguio (*Carassius auratus*.) e esturjão (*Huso huso*) após a vacinação contra *A. hydrophila*, ministrada via oral e intraperitoneal, respectivamente (IRIANTO; ROBERTSON; AUSTIN, 2003; KHOSHBAVAR-ROSTAMI; SOLTAN; HASSAN, 2007).

O peixe olho-de-boi (*Seriola dumerili*), com uso de vacina por injeção intraperitoneal, imersão e via oral contra o *Vibrio holllisae*, também apresentou maior atividade de lisozima em relação a outro grupo, não vacinado, sendo que os animais vacinados por injeção obtiveram o melhor resultado, nesta análise, entre os grupos testados (RONGXING et al., 2008).

Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*), vacinadas por injeção contra quatro diferentes antígenos de *Pseudomonas fluorescens*, apresentaram um aumento de lisozima em todos os grupos imunizados, em comparação ao grupo não vacinado, na 1º, 2º e 4º semanas após a vacinação (ATTIA et al., 2012).

Resultados semelhantes também foram encontrados por Silva et al. (2012). Neste estudo, foi avaliada a resposta imune de surubins híbridos vacinados por injeção intraperitoneal e por imersão, contra *A. hydrophila*. Os autores observaram que o grupo vacinado por imersão apresentou concentração de lisozima igual ao grupo vacinado por injeção intraperitoneal, e superior ao grupo não vacinado. Já a concentração de proteínas totais nos animais vacinados foi igual e superior ao controle.

**Figura 5:** Concentração de lisozima ( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) do plasma de surubins híbridos não vacinados e não suplementados com probiótico (C); apenas suplementados com probiótico (P); apenas vacinado intraperitoneal com reforço oral (V) e vacinados intraperitoneal com reforço oral e suplementação com probiótico (PV).



\*Letras distintas indicam diferenças significativas pelo teste Tukey de comparação de médias ( $p < 0,05$ ).

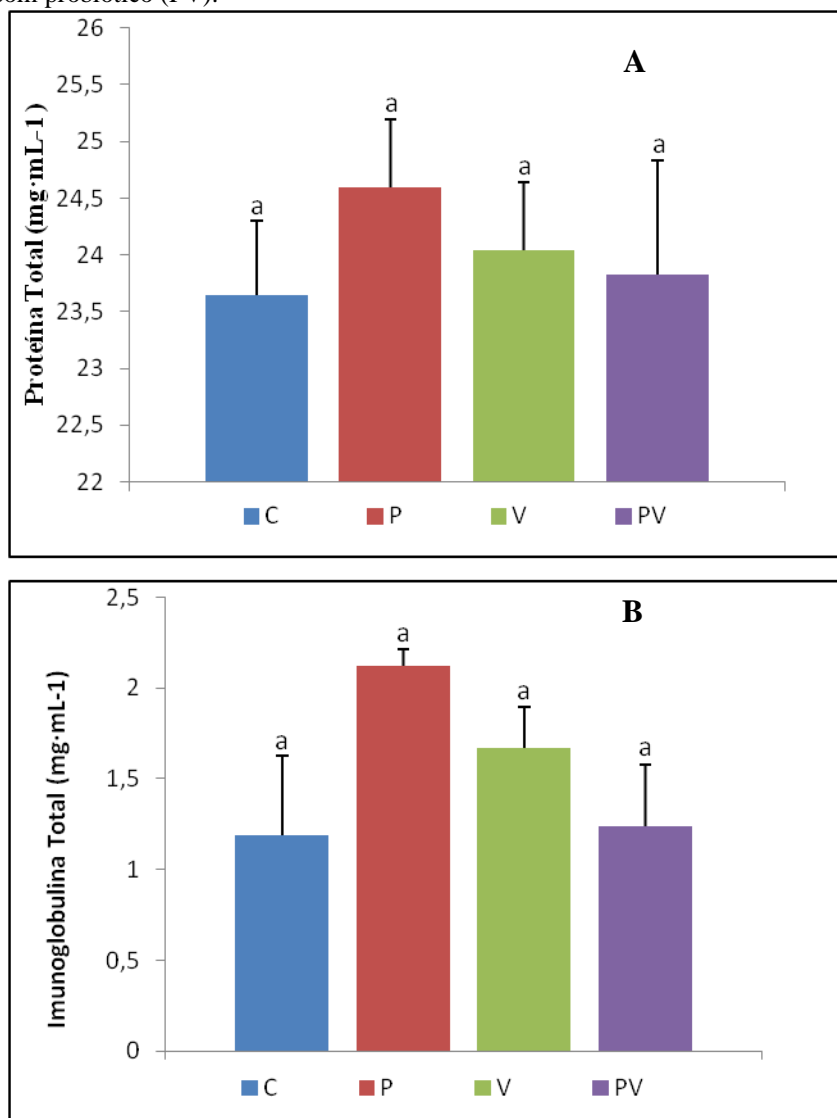
Em contrapartida, enguias (*Anguilla anguilla*) que receberam vacina bivalente contra dois soros tipos patogênicos de *Vibrio vulnificus*, por diferentes vias (ESTEVE-GASSENT; FOUZ; AMARO, 2004), e Tilápia do Nilo, infectada com *Streptococcus iniae* (SHOEMAKER et al., 2006b) não mostraram alteração na atividade da lisozima.

Já em trabalhos realizados com suplementação de *Bacillus probionts* como probiótico na dieta de truca arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*), também foi observado o aumento significativo da atividade sérica da lisozima (MERRIFIELD et al., 2010 b), fato igualmente observado anteriormente por Panigrahi et al. (2009), onde administraram alimentação com três diferentes probióticos (*Lactobacillus rhamnosus*, *Bacillus subtilis* e *Enterococcus faecium*) para truca arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*). Por outro lado, MOURIÑO et al. (2012) não detectaram diferenças na concentração de proteína total e de lisozima sérica em pintado híbrido (*Pseudoplatystoma corruscans* x *P. fasciatum*), alimentados com *Weissella cibaria*, quando comparados com peixes que não receberam probiótico na dieta. Wang et al. (2008) não encontraram diferenças na concentração de proteína total e de lisozima em Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com probiótico *Enterococcus faecium*.

Neste estudo, a concentração de proteína total do plasma também não apresentou diferenças significativas entre os tratamentos, assim como para a imunoglobulina (Figura 6 A e B). Isso pode estar relacionado com o processo de resposta imune dos peixes. Durante o período de infecção, os animais normalmente entram em um jejum que precede à resposta imune inata, geralmente de curta duração. Posteriormente, é ativado o sistema imune adaptativo, que é específico e de longa duração, envolvendo muitas células e moléculas imunoefetoras, como as imunoglobulinas. Em peixes, o período necessário para ativação da resposta específica pode levar de 10 a 12 semanas, o que deve ser

levado em consideração quando a vacinação for considerada uma medida profilática na aquicultura (MAGNADOTTIR, 2010).

**Figura 6:** Concentração de proteínas totais (A) e concentração de imunoglobulina total (B) do plasma de surubins híbridos não vacinados e não suplementados com probiótico (C); apenas suplementados com probiótico (P); apenas vacinados intraperitoneal com reforço oral (V) e vacinados intraperitoneal com reforço oral e suplementação com probiótico (PV).



\*Letras distintas indicam diferenças significativas pelo teste Tukey de comparação de médias ( $p < 0,05$ ).

Corroborando com este trabalho, carpas (*Cyprinus carpio*) vacinadas com células inativadas por formalina, e outros tipos de vacinas, em baixa temperatura (12 °C), contra *Aeromonas bestiarum*, não apresentaram diferenças significativas na concentração de proteínas totais (nos diferentes tratamentos e nos dois períodos analisados), e na concentração de imunoglobulina total, após 7 dias da vacinação. O aumento significativo da concentração de imunoglobulina total só foi averiguado 30 dias após a vacinação (KOZINSKA; GUZ, 2004).

Tal fato pode estar relacionado com a temperatura da água, pois baixas temperaturas têm efeito supressor do sistema imunológico (AVTALION, 1969; LANGSTON et al., 2002), deprimem a resposta imune específica, e enfatizam a resposta imunológica não específica, principalmente no

período de inverno (MORVAN; TROUTAUD; DESCHAUX, 1998). Segundo estudos a respeito dos efeitos da temperatura de 8, 12, 15 e 18 °C, em relação à resposta não específica e aos parâmetros hematológicos de Alabote do Atlântico (*Hippoglossus hippoglossus*), foi observado que a temperatura tem influência considerável sobre alguns parâmetros sanguíneos (percentual de hematócrito e a população de leucocitos), e nos parâmetros humorais (atividade da lisozima e os níveis de proteína no soro) (LANGSTON et al., 2002). No presente trabalho, a temperatura da água no experimento se manteve constante, a 28 °C, e não se sabe se este fator teria influenciado na não detecção da imunoglobulina pelo método de PEG, ou se este método não é sensível.

Ao contrário dos resultados obtidos neste trabalho, Tu et al. (2010) observaram um acréscimo das moléculas de imunoglobulina do soro de Tilápia do Nilo contra *A. hydrophila*, entre a quarta e a sétima semanas após a imunização, com uma temperatura experimental de  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ . Silva et al. (2012), que trabalharam com temperatura experimental de  $26,8 \pm 0,6^\circ\text{C}$ , também relataram um aumento na concentração de imunoglobulina e de proteína total em surubins híbridos vacinados contra *A. hydrophila* por injeção intraperitoneal e por imersão, em relação ao controle.

Da mesma forma que muitos trabalhos de vacinação, estudos com a suplementação de probiótico em dietas para peixes também tem promovido um aumento na concentração de imunoglobulinas. Trutas arco-íris (*Oncorhynchus mykiss*) alimentadas com probiótico *Lactobacillus rhamnosus* apresentaram um significativo aumento no nível de imunoglobulinas depois de apenas uma semana (NIKOSKELAINEN et al., 2003).

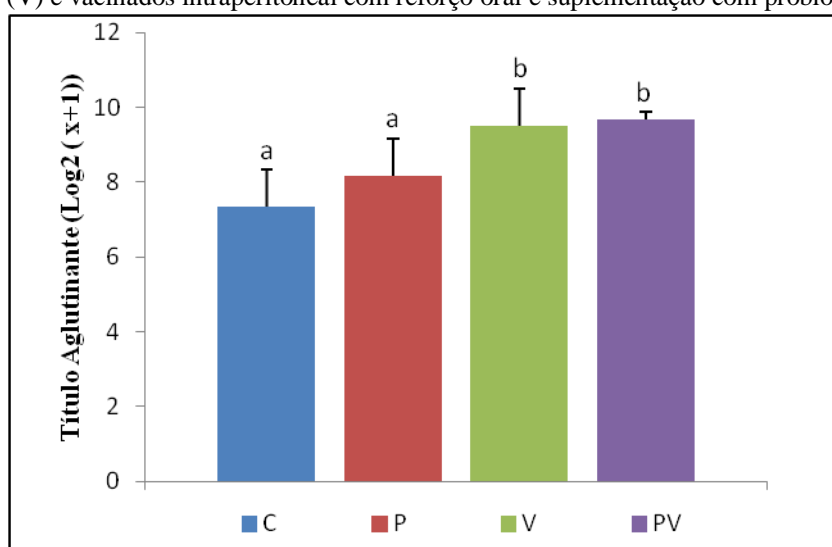
Em Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com quatro diferentes probióticos, *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus plantarum*, mistura de ambos os isolados bacterianos (*B. subtilis* e *L. plantarum*) e a levedura *Saccharomyces cerevisiae* observou-se um aumento significativo na concentração de imunoglobulina total. O maior valor significativamente registrado foi no grupo que recebeu os dois isolados bacterianos simultaneamente (EL-EZABI et al., 2011). Este fato foi igualmente evidenciado e confirmado por Ridha e Azad (2012) com Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) alimentadas com *Bacillus sp.* e *Lactobacillus sp.*, porém não observam diferença significativa na concentração de proteína total, assim como o encontrado neste trabalho. E em Surubim híbridos (*Pseudoplatystoma sp.*) alimentados com dietas contendo *Weissella cibaria* houve também o aumento de imunoglobulina (MOURIÑO et al., 2012).

A vacinação experimental realizada neste trabalho promoveu um incremento no título aglutinante nos grupos que receberam o tratamento V e o grupo que recebeu o tratamento PV, em comparação aos grupos C e P (Figura 7). Com isto, demonstra-se que houve um aumento nas moléculas de lectinas, como a lectina de ligação a manose, que pode atuar com aglutinina bacteriana ou opsonina, e de imunoglobulinas. Este aumento na concentração de imunoglobulinas não foi observado no teste de imunoglobulina total pelo método PEG. Talvez isto se deva à pouca sensibilidade do teste. Segundo Amar et al. (2000), este método não aponta uma estimativa precisa do

conteúdo de imunoglobulina, já que o precipitado contém aproximadamente 10% de componentes que não são imunoglobulinas. Entretanto, a metodologia foi utilizada neste trabalho apenas para obtenção de valores comparativos.

Corroborando com o presente trabalho, Tilápias do Nilo (*Oreochromis niloticus*) imunizadas com vacina polivalente, também mostraram aumento no título aglutinante do soro contra *A. hydrophila*, *Pseudomonas aeruginosa* e *E. durans* (SILVA et al., 2009; BAILONE et al., 2010). Assim como, surubins híbridos vacinação por injeção intraperitoneal contra *A. hydrophila* (SILVA et al., 2012).

**Figura 7:** Resultados do título de aglutinação ( $\log_2 x+1$ ) do plasma de surubins híbridos não vacinados e não suplementados com probiótico (C); apenas suplementados com probiótico (P); apenas vacinado intraperitoneal com reforço oral (V) e vacinados intraperitoneal com reforço oral e suplementação com probiótico (PV).

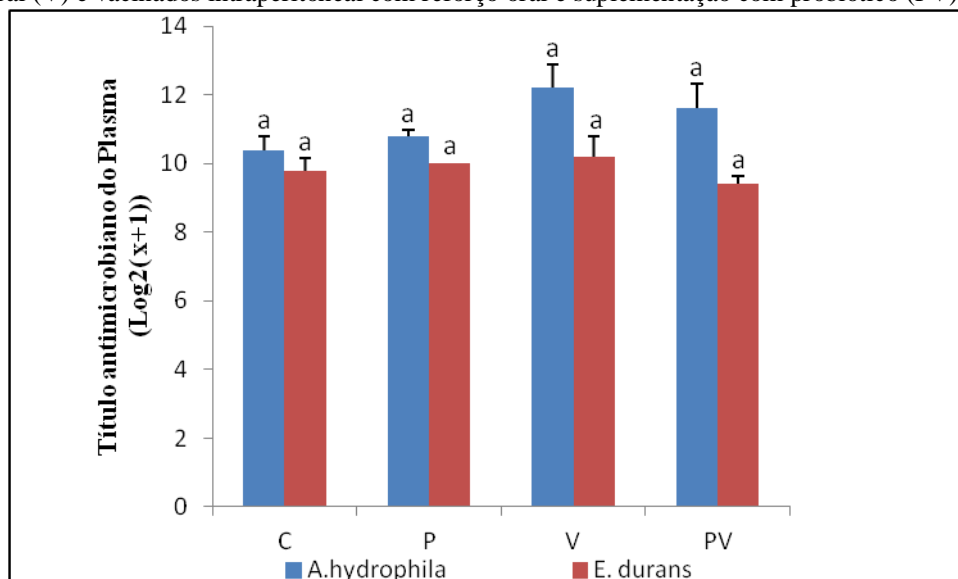


\*Letras distintas indicam diferenças significativas pelo teste Tukey de comparação de médias ( $p < 0,05$ ).

A atividade antimicrobiana do soro de peixes teleósteos é decorrente de vários tipos de proteínas e enzimas, como transferinas, antiproteases, peptídeos antimicrobianos e as lisozimas. O aumento na atividade antimicrobiana corresponde a uma melhoria na resposta imune humoral inata dos peixes (ELLIS, 1999). No entanto, observou-se que o título antimicrobiano do plasma não apresentou diferença significativa entre os tratamentos, e em ambas as bactérias testadas (*A. hydrophila* e *E. durans*) (Figura 8).

Em trabalho realizado anteriormente com imunização em tilápia do Nilo (*Oreochromis niloticus*) com diferentes tipos de vacinação (oral, imersão e intraperitoneal) apresentaram maior título antimicrobiano do soro quando comparados com o grupo controle (SILVA et al., 2009). Tal fato, também foi observado em estudos com surubins híbridos vacinados por injeção intraperitoneal por imersão contra *A. hydrophila* (SILVA et al., 2012).

**Figura 8:** Resultado do título antimicrobiano ( $\log_2(x+1)$ ) do plasma de surubins híbridos não vacinados e não suplementados com probiótico (C); apenas suplementados com probiótico (P); apenas vacinado intraperitoneal com reforço oral (V) e vacinados intraperitoneal com reforço oral e suplementação com probiótico (PV).



\*Letras distintas indicam diferenças significativas pelo teste Tukey de comparação de médias ( $p < 0,05$ ).

## 5. CONCLUSÃO

Os resultados apresentados nesse trabalho demonstram que surubins híbridos vacinados, e que receberam suplementação probiótica, mostraram melhorias significativas nos parâmetros imunes. Destacam-se a lisozima, no grupo PV, e aglutinação, nos grupos V e PV, proporcionando melhor resposta imunológica. Porém, mais estudos são necessários para demonstrar a eficiência da vacinação e suplementação com probiótico após um desafio bacteriano.

## 6. CONSIDERAÇÕES FINIAS

Sugere-se que em trabalhos futuros, o parâmetro de concentração de imunoglobulinas deve ser realizado pelo método de Elisa, pois se mostra mais sensível e específico que o PEG, presentemente utilizado.

Em trabalhos futuros, propõe-se o teste de imunização e a suplementação com probiótico de surubins híbridos mediante aplicação desses tratamentos sobre temperaturas diferentes, a fim de averiguar a influência deste parâmetro físico na produção anticorpos.



## 7. REFERENCIAS

- ABBAS A.K.; LICHTMAN A.H. **Cellular and Molecular Immunology**. 5th ed. Elsevier Science. Philadelphia, PA: Elsevier, p. 10, 2003.
- AMAR, E.C. et al. Effect of dietary  $\beta$ -carotene on the immune response of rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. **Fisheries Science**, v. 66, p. 1068-1075, 2000.
- ANDRADE, L.S. et al. Canibalismo entre larvas de pintado, *Pseudoplatystoma corruscans*, cultivadas sob diferentes densidades de estocagem. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v. 26, p. 299-302, 2004.
- ARIJO, S. et al. Effectiveness of a divalent vaccine for sole, *Solea senegalensis* (Kaup), against *Vibrio harveyi* and *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. **Journal of Fish Diseases**, v.28, p.33-38, 2005.
- ATTIA, A. et al. Effect of Injection Vaccination against *Pseudomonas fluorescens* on Specific and Non-Specific Immune Response of Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Using Different Prepared Antigens. **Open Access Scientific Reports**, v. 1, ed. 12, 2012.
- AUSTIN, B.; AUSTIN, D.B. **Bacterial fish pathogens in farmed and wild fish**. 2nd ed. Ellis Horwood Ltd., Chichester, England, 364p., 2007.
- AVTALION, R.R. Temperature effect on antibody production and immunological memory, in carp (*Cyprinus carpio*) immunized against bovine serum albumin (BSA). **Immunology**, v.17, p. 927–31, 1969.
- BAILONE, R.L. et al. Hematology and agglutination titer after polyvalent immunization and subsequent challenge with *Aeromonas hydrophila* in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). **Arch Med Vet.**, V.42, p. 221-227, 2010.
- BALCÁZAR, J. L. et al. Review: The role of probiotics in aquaculture. **Veterinary Microbiology**, v. 114, p. 173–186, January, 2006.
- BARBOSA, M.C. et al. Cultivation of juvenile fat snook (*Centropomus parallelus* Poey, 1860) fed probiotic in laboratory conditions. **Braz Arch of Biol and Tech.**, v. 54(4), p. 795-801, 2011.
- BRASIL. Ministério de Pesca e Aquicultura (MPA). **Boletim estatístico de pesca e aquicultura**, Brasil, 2010.
- BRITSKI, H.A.; SATO, Y.; ROSA, A.B.S. **Manual de identificação de peixes da região de Três Marias**. 3. ed. Brasília: CODEVASF, p. 115, 1988.
- BITRAGO-SUÁREZ, U.A.; BURR, B.M. Taxonomy of the catfish genus *Pseudoplatystoma* Bleeker (Siluriforme: Pimelodidae) with recognition of eight species. **Zootaxa**, v. 1512, p.1-38, 2007.
- CAMPECHE, D. F. B. et al. **Peixes nativos do Rio São Francisco adaptados para cultivo**. 1. ed. Doc. 244. Petrolina: Embrapa Semiárido, 2011.
- CAMPOS, J. L. Pintado culture in Brazil. **Global Aquaculture Advocate.**, v. 42, p. 42-43, Abr, 2004.

CAMPOS, J.L. O cultivo do pintado (*Pseudoplatystoma curruscans*, Spix; Agassiz, 1829), outras espécies do gênero *Pseudoplatystoma* e seus híbridos. In: BALDISSEROTTO, B.; GOMES, L. C. (Orgs.). **Espécies nativas para a piscicultura no Brasil**. 2. ed. rer. e ampl. Santa Maria : Ed. da UFSM, 2010.

CARNEVALI, O. et al. Growth improvement by probiotic in European sea bass juveniles (*Dicentrarchus labrax*, L.), with particular attention to IGF-1, myostatin and cortisol gene expression. **Aquaculture**, v. 258, p. 430–438, August, 2006.

CHENG, S. et al. Analysis of the vaccine potential of a laboratory *Escherichia coli* strain in a Japanese flounder model. **Fish Shellfish Immunol.**, v. 28, p.275-280, 2010.

CREPALDI, D.V. et al. O surubim na aquacultura do Brasil. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 30, p. 150-158, 2006.

DECAMP, O.; MORIARTY, D.J.W. Safety of aquaculture probiotics. Health management. **Global Aquaculture Advocate**, April/may, 2006.

DEODHAR L.P.; SARASWATHI K.; VARUDKAR, A. *Aeromonas* spp. and their association with human diarrheal disease. **Journal of Clinical Microbiology** , v. 29(5), p. 853-856, 1991.

DUNG, T.T. et al. Common diseases of pangasius catfish farmed in Vietnam. **Global Aquaculture Advocate**, v.11(4), p.77-78, 2008.

EL-EZABI, M. M. et al. The viability of probiotics as a factor influencing the immune response in the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. **Egypt J. Aquat. Biol. & Fish.**, v.15, No.1, p.105 – 124, 2011.

ELLIS, A.E. Furunculosis: protective antigens and mechanisms. In: **Furunculosis: Multidisciplinary. Fish Disease Research.** (ed. by E. Science), p. 366-381. Academic Press, London, 1997.

ELLIS, A.E. Immunity to bacteria in fish. **Fish Shellfish Immun.**, v. 9, p. 291–308, 1999.

ENCARNAÇÃO, P. Varied Feed Additives Improve Gut, Animal Health. **Global Aquaculture Advocate**, v. 3 (5/6), p. 41 – 41, 2010.

ESTEVE-GASSENT, M. D.; FOUZ. B.; AMARO, C. Efficacy of a bivalent vaccine against eel diseases caused by *Vibrio vulnificus* after its administration by four different routes. **Fish Shellfish Immunol.**, v. 16, p. 93-105, 2004.

FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations). **The State of World Fisheries and Aquaculture**, Roma, 2012.

FERREIRA, D.; GIL BARCELLOS, L. J. Enfoque combinado entre as boas práticas de manejo e as medidas mitigadoras de estresse na piscicultura. **B. Inst. Pesca**, São Paulo, v. 34(4), p. 601 - 611, 2009.

FIGUEIREDO, H. C. P.; LEAL, C. A. G. Tecnologias aplicadas em sanidade de peixes. **R. Bras. Zootec.**, v.37, suplemento especial p.08-14, 2008.

GATESOUBE, F.J. Updating the importance of lactic acid bacteria in fish farming: natural occurrence and probiotic treatments. **J. Mol. Microbiol. Biotechnol.**, v. 14, p. 107–114, 2008.

GATESOUBE, F.J. The use of probiotics in aquaculture. **Aquaculture**, v.180, p.147–165, 1999.

HOLLIMAN, A. The veterinary approach to trout. In: BROWN. L. (Ed.). **Aquaculture for veterinarians: fish husbandry and medicine**. Oxford: Pergamon Press, p.223-247, 1993.

INOUE, L. A. K. A. et al. **Princípios básicos para produção de alevinos de surubins (pintado e cachara)**. Dourados: Embrapa Agropecuária Oeste; Manaus: Embrapa Amazônia Ocidental; Corumbá: Embrapa Pantanal. 1. ed., 2009.

IRIANTO, A.; ROBERTSON, P.A. ; AUSTIN, B. Oral administration of formalin-inactivated cells of *Aeromonas hydrophila* A3-51 controls infection by atypical *A. salmonicida* in goldfish, *Carassius auratus* (L.). **J. Fish Dis.**, v. 26, p. 117–120, 2003.

JATOBA, A. et al. Lactic-acid bacteria isolated from the intestinal tract of Nile tilapia utilized as probiotic. **Pesq. Agrop. Bras.**, v. 43, p. 1201–1207, 2008.

KHOSHBAVAR-ROSTAMI, H.A.; SOLTANI, M.; HASSAN, H.M.D. Immune responses of great sturgeon *Huso huso* to *Aeromonas hydrophila* bacterin. **J. Fish Biol.**, v.70, p. 1931-1938, 2007.

KOZINSKA, A. Dominant pathogenic species of mesophilic aeromonads isolated from diseased and healthy fish cultured in Poland. **J. Fish Dis.**, 30, 293-301, 2007.

KOZINSKA, A.; GUZ, L. The effect of various *Aeromonas bestiarum* vaccines on non-specific immune parameters and protection of carp (*Cyprinus carpio* L.). **Fish Shellfish Immunology**, v. 16, p. 437–445, 2004.

KUBITZA, F. Tilápias: principais parasitoses e doenças em tilápias. **Panorama da Aquicultura**, Rio de Janeiro, v. 10, n. 60, p. 39-53, julho/agosto, 2000.

LANGSTON, A.L. et al. The effect of temperature on non-specific defence parameters of three strains of juvenile Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.). **Fish & Shellfish Immunology**, v.12, p.61–76, 2002.

LIM, C.; LÜCKSTÄDTS, C.; KLESIUS, P.H. Review: Use of organic acids, salts in fish diets. **Global Aquaculture Advocate**, v. v.5 (9/10), p. 45 - 46, 2010.

LÜCKSTÄDTS, C. Acidifiers in aquaculture prove beneficial. **Feed Mix**, v.14 (3), p. 11-12, 2006.

MAGNADOTTIR, B. Immunological Control of Fish Diseases. **Marine Biotechnology**, v. 12, p. 361-379, March, 2010.

MAGNADOTTIR, B. Innate immunity of fish (overview). **Fish & Shellfish Immunology**, v.20, p.137-151, 2006.

MARTINS, M. L. et al. Haematological changes in Nile tilapia experimentally infected with *Enterococcus* sp. **Braz. J. Biol.**, v. 68(3), p. 657-661, 2008.

MERRIFIELD, D. L. et al. Probiotic applications for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) I. Effects on growth performance, feed utilization, intestinal microbiota and related health criteria. **Aquaculture Nutrition**, v. 16, n. 5, p. 504-510, Oct 2010b.

- MERRIFIELD, D.L. et al. The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. **Aquaculture**, v. 302, p. 1–18, abr 2010a.
- MORVAN, C. L.; TROUTAUD, D.; DESCHAUX, P. Differential effects of temperature on specific and non-specific immune defence in fish. **The Journal of Experimental Biology**, v. 201, p.165–8, 1998.
- MOURIÑO, J. L. P. et al. Effect of dietary supplementation of inulin and *W. cibaria* on haemato-immunological parameters of hybrid surubim (*Pseudoplatystoma sp.*). **Aquaculture Nutrition**, Feb., 2012.
- NIKOSKELAINEN, S. et al. Immune enhancement in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by potential probiotic bacteria (*Lactobacillus rhamnosus*). **Fish & Shellfish Immunology**, v. 15, n. 5, p. 443-452, Nov 2003.
- PANIGRAHI, A. et al. Probiotic Induced Immunomodulation: Investigation into the Cellular and Molecular Mechanism Involved. **Research Journal of Biotechnology**, v. 4, n. 3, p. 7-13, Aug 2009.
- PAVANELLI, G.C.; EIRAS, J.C.; TAKEMOTO, R.M. **Doenças de peixes: profilaxia, diagnóstico e tratamento**. Editora da Universidade Estadual de Maringá, 305p. 1998.
- PEIXOTO, L.J.S. et al. *Aeromonas* spp.: Fatores de virulência e perfis de resistência a antimicrobianos e metais pesados, **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.79, n.3, p.453-461, jul./set., 2012.
- PLANT, K. P.; LAPATRA, S.E. Advances in fish vaccine delivery. **Developmental and Comparative Immunology**, v.35, p.1256–1262, 2011.
- PRIDGEON, J. W.; KLESIUS, P.H. Fish Vaccines In Aquaculture: Proactive Treatment Protects Salmon, Catfish, Other Fish. **Global Aquaculture Advocate**, May/June, 2010.
- RIDHA, M. T.; AZAD, I. S. Preliminary evaluation of growth performance and immune response of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* supplemented with two putative probiotic bacteria. **Aquaculture Research**, v. 43, n. 6, p. 843-852, 2012.
- RINGO, E.; OLSEN, R. E.; MAYHEW, T. M.; MYKLEBUST, R. Electron microscopy of the intestinal microflora of fish. **Aquaculture**, Amsterdam, n. 227, p. 395 – 415, 2003.
- ROMALDE, J.L. et al. Oral immunization using alginate microparticles as a useful strategy for booster vaccination against fish lactococcosis. **Aquaculture**, v. 236, p. 119-129, 2004.
- RONGXING, J.I. et al. Vaccination in three different ways against vibriosis of *Seriola dumerili* caused by *Vibrio hollisae*. **Chinese Journal of Oceanology and Limnology**, v. 26 , No. 3, p. 233-237, 2008.
- SANKARAN, K.; GURNANI, S. Variation in Catalytic Activity of Lysozyme in Fishes. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**, v. 9, 162-&., 1972.
- SECOMBES, C.J. **The Nonspecific Immune System: Celular Defensas**. In: IWAMA, G., NAKANISHI, T. The Fish Immune System. London: Academic Press, p. 63-105, 1996.
- SHOEMAKER, C. A. et al. Protection against heterologous *Streptococcus iniae* isolates using a modified bacterin vaccine in Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.). **J Fish Dis.**, v. 33, p. 537-544, 2010.

SHOMAKER, C.A. et al. Growth response and acquired resistance of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* (L.) that survived *Streptococcus iniae* infection. **Aquacult. Res.**, v. 37, p. 1238-1245, 2006b.

SHOME, B.R.; SHOME, R. Evaluation of three types of *Aeromonas hydrophila* vaccines against acute infectious dropsy disease in Indian major carps. **Indian Journal of Fisheries**, v. 52, p. 405-412, 2005.

SILVA, B.C. et al. Haemorrhagic septicaemia in the hybrid surubim (*Pseudoplatystoma corruscans* x *Pseudoplatystoma fasciatum*) caused by *Aeromonas hydrophila*. **Aquaculture Research**, v. 43, p. 908-916, 2012.

SILVA, B.C. **Septicemia hemorrágica em surubim híbrido (*Pseudoplatystoma corruscans* x *P. fasciatum*) causada por *Aeromonas hydrophila***. Dissertação (Mestre em Aquicultura) - Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 70 f., 2010.

SILVA, B.C. et al. Hematological and immunological responses of Nile tilapia after polyvalent vaccine administration by different routes. **Pes Vet Bras.**, v. 29, p. 874-880, 2009.

SILVA, F. C. P.; BRITO, M. F. G.; FARIAS, L. M.; NICOLI, J. R. Composition and antagonistic activity of the indigenous intestinal microbiota of *Prochilodus argenteus* Agassiz. **Journal of Fish Biology**, London, v. 67, p. 1686 – 1698, 2005b.

SWAIN, P.; SAHOO, P. K.; AYYAPPAN, S. **Fish and shellfish immunology: an introduction**. Delhi, India: Narendra Publishing House, p. 296, 2006.

TAVARES-DIAS, M.; MORAES, F. R. **Hematologia de peixes teleósteos**. Ribeirão Preto: Lillimpress Complexo Gráfico, 2004.

TIZARD, I.R. **Imunologia veterinária: uma introdução**. São Paulo: Roca, p. 532, 2002.

TU, F. P. et al. Effect of oral immunization with *Aeromonas hydrophila* ghosts on protection against experimental fish infection. **Lett Appl Microbiol.**, v. 50(1), p. 13-17, 2010.

URIBE, C. et al. Innate and adaptive immunity in teleost fish: a review. **Veterinarni Medicina**, v. 56, p. 486-503, 2011.

VANDENBERG, G.W. Oral vaccines for finfish: academic theory or commercial reality? **Anim Health Res Rev**, v. 5, p. 301-304, 2004.

VIEIRA, F.N. et al. Lactic-acid bacteria increase the survival of marine shrimp, *Litopenaeus vannamei*, after infection with *Vibrio harveyi*. **Braz. J. Ocean.**, v. 4, p. 251-255, 2007.

VIEIRA, F.N. et al. Time-related action of *Lactobacillus plantarum* in the bacterial microbiota of shrimp digestive tract and its action as immunostimulation. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 43, p. 763-769, 2008.

YANO, T. The nonspecific immune system: Humoral defense. In: IWANA, G.; NAKANISHI, T. **The Fish Immune System**, Academic Press, San Diego, p. 207- 243. 1996.

WANG, Y. B. et al. Effect of probiotics, *Enterococcus faecium*, on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response. **Aquaculture**, v. 277, n. 3-4, p. 203-207, Jun 3 2008.

WOO, P.T.K.; BRUNO, D.W (Ed.). **Fish Diseases and Disorders**. Viral, Bacterial and Fungal Infections, CABI Publishing, Wallingford, Oxfordshire, U.K., v. 3, p. 874, 2003.

ZANIBONI-FILHO, E. Piscicultura das espécies nativas de água doce. In: POLI, C.R.; POLI, A.T. et al. (Orgs). **Aquicultura: Experiências Brasileiras** Florianópolis: Multitarefa Editora, p.337-368, 2004.